

SOURNESS REPRESANT, PLASMID FOR PLANT, TRANSFORMED CELL AND PLANT, AND PRODUCTION OF CURCULIN

Patent number: JP10215884
Publication date: 1998-08-18
Inventor: KURIHARA YOSHIE; ARAI SOICHI; ANZAI HIROYUKI; KATSUMATA KAZUKO; YAMASHITA HARUYUKI; SUGIYAMA HIROSHI
Applicant: KURIHARA YOSHIE; ARAI SOICHI; MEIJI SEIKA KAISHA; ASAHI DENKA KOGYO KK
Classification:
- **International:** A01H5/00; A23J3/14; A23L1/00; A23L1/22; C07K14/415; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; C12P21/02; A01H5/00; A23J3/00; A23L1/00; A23L1/22; C07K14/415; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/09; A01H5/00; A23J3/14; A23L1/00; A23L1/22; C07K14/415; C12N5/10; C12P21/02; C12N15/09; C12R1/91; C12N5/10; C12R1/91; C12P21/02; C12R1/91
- **European:**
Application number: JP19970352320 19971205
Priority number(s): JP19970352320 19971205; JP19960342706 19961206

Report a data error here

Abstract of JP10215884

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce curculin B repressing sourness and having activity of reducing sourness or making itself tasteless as an effective component in sourness repressive agent suitable for foods by producing curculin B through transformed cells originated from plants.

SOLUTION: Curculin B which is a polypeptide including an amino acid sequence of the formula is produced through transformed cells or transformed plants containing them. Deoxyribonucleic acids coding the curculin B are prepared by means of a known genetic technology method and/or a chemical synthetic method. The base sequence wholly coding the complementary deoxyribonucleic acid(cDNA) of the curculin B is disclosed in the Japan Patent official gazette H06-189771. The curculin B is obtained e.g. by transforming cells originated from plants with a plasmid including the cDNA between a sequence containing a promoter able to functionate in plants and a sequence containing a terminator able to functionate in plants and then by extracting the curculin B from the resultant transformant.

Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Ala	Asp	His	Ser	Leu
1					5				10					15	
Gln	Ala	Gly	Ala	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Cys	Asn	Leu	Val
				20				25						30	
Lys	Tyr	Gln	Asn	Gly	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala	Ser	Asn	Thr	Asp	Arg	Arg
				35				40						45	
Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	Gly	Asn	Leu	Val	Ile
				50				55						60	
Tyr	Asp	His	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Tep	Gly	Ser	Ala	Cys	Trp	Gly	Asp
						70				75				80	
Asn	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Lys	Asp	Gly	Arg	Phe	Val	Ile
						85				90				95	
Tyr	Gly	Pro	Val	Leu	Trp	Ser	Leu	Gly	Pro	Asn	Gly	Cys	Arg	Arg	Val
				100						105				110	
Asn	Gly														

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 1 0 - 2 1 5 8 8 4

(43) 公開日 平成 1 0 年 (1 9 9 8) 8 月 1 8 日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 15/09	ZNA		C12N 15/00	ZNA A
A01H 5/00			A01H 5/00	A
A23J 3/14			A23J 3/14	
A23L 1/00			A23L 1/00	H
1/22			1/22	Z

審査請求 未請求 請求項の数 1 1 F D (全 1 3 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平 9 - 3 5 2 3 2 0	(71) 出願人	3 9 1 0 2 6 2 5 4 栗原 良枝 東京都世田谷区奥沢 7 - 4 - 7
(22) 出願日	平成 9 年 (1 9 9 7) 1 2 月 5 日	(71) 出願人	5 9 1 0 5 8 9 9 8 荒井 綜一 神奈川県横浜市神奈川区七島町 3 8
(31) 優先権主張番号	特願平 8 - 3 4 2 7 0 6	(71) 出願人	0 0 0 0 0 6 0 9 1 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋 2 丁目 4 番 1 6 号
(32) 優先日	平 8 (1 9 9 6) 1 2 月 6 日	(71) 出願人	0 0 0 0 0 0 3 8 7 旭電化工業株式会社 東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番 3 5 号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 森田 憲一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 酸味抑制剤、植物用プラスミド、形質転換細胞及び形質転換植物、並びにクルクリン製造方法

(57) 【要約】

【課題】 酸味を抑制して酸味を軽減ないし無味化することのできる酸味抑制剤を提供する。食品用として好適なクルクリン B 又はクルクリン B 類似体の大量生産に利用可能な植物用プラスミド、及びそれを用いるクルクリン B 又はクルクリン B 類似体の製造方法を提供する。

【解決手段】 酸味抑制剤は、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を有効成分として含む。植物用プラスミドは、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体をコードする DNA を、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列と、植物で機能することのできるターミネーターを含む配列との間に含む。前記植物用プラスミドで、植物由来の細胞を形質転換して得られる形質転換細胞又は形質転換植物から、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を抽出する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 配列表の配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は (2) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、酸味抑制剤。

【請求項 2】 (1) 配列表の配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする DNA、又は (2) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドをコードする DNA を、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列と、植物で機能することのできるターミネーターを含む配列との間に含むことを特徴とする、プラスミド。

【請求項 3】 前記プロモーターが、トウモロコシユビキチンプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス 3' 5' S プロモーター、及びイネアクチンプロモーターからなる群から選んだプロモーターである、請求項 2 に記載のプラスミド。

【請求項 4】 前記ターミネーターが、ノバリンシンターゼターミネーター又はカリフラワーモザイクウイルス 3' 5' S ターミネーターである、請求項 2 又は請求項 3 に記載のプラスミド。

【請求項 5】 前記プロモーターを含む配列内の、プロモーターの制御配列を含む配列の 3' 末端と、前記ターミネーターを含む配列内の、ターミネーターの制御配列を含む配列の 5' 末端との間に、植物で機能することのできるイントロンを更に含む、請求項 2 ～請求項 4 のいずれか一項に記載のプラスミド。

【請求項 6】 前記イントロンが、トウモロコシユビキチンイントロンである請求項 5 に記載のプラスミド。

【請求項 7】 請求項 2 ～請求項 6 のいずれか一項に記載のプラスミドで、植物（但し、クルクリゴ・ラチフォリアを除く）由来の細胞を形質転換して得られることを特徴とする、形質転換細胞。

【請求項 8】 前記植物が食用植物である、請求項 7 に記載の形質転換細胞。

【請求項 9】 請求項 7 に記載の形質転換細胞を含む、形質転換植物。

【請求項 10】 前記植物が食用植物である、請求項 9 に記載の形質転換植物。

【請求項 11】 請求項 7 若しくは請求項 11 に記載の形質転換細胞又は請求項 9 若しくは請求項 13 に記載の形質転換植物から、(1) 配列表の配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は (2) 前記アミノ酸配列において 1 個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを抽出するこ

とを特徴とする、前記ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、酸味抑制剤、植物用プラスミド、そのプラスミドで形質転換することにより得られる形質転換細胞及び形質転換植物、並びにその形質転換細胞又は形質転換植物を用いるクルクリンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 クルクリゴ・ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) は、マレーシアやタイ等に自生するキンバイザサ科（あるいは、分類の仕方によってはヒガンバナ科）に属する植物である。このクルクリゴ・ラチフォリアの果実に含まれるタンパク質であるクルクリンは、それ自体が甘味を有し、無味な飲食物（例えば、水）を甘く感じさせる活性を有すると共に、酸味を甘味に感じさせる活性も有することが知られている。マレーシアでは、クルクリゴ・ラチフォリアの果実を砂糖の代替物としてコーヒーや紅茶を飲むときに用いたり、時には肉を煮る際の軟化剤として、あるいは、食欲増進剤として用いてきた歴史がある。クルクリンのアミノ酸配列については、クルクリン同族体の 1 つであるクルクリン A の全アミノ酸配列が特開平 3 - 1 9 0 8 9 9 号公報に開示され、クルクリン同族体の 1 つであるクルクリン B の成熟体及び前駆体の塩基配列及びアミノ酸配列が特開平 6 - 1 8 9 7 7 1 号公報に開示されている。

【0003】 クルクリンの生産は、特開平 2 - 1 0 4 2 6 3 号、特開平 2 - 8 4 1 5 7 号、特開平 2 - 8 4 1 6 0 号、及び特開平 2 - 8 4 1 6 1 号の各公報に記載の技術を用いることにより実施することが可能である。これらの方法では、クルクリゴ・ラチフォリアの果実よりクルクリン A を抽出している。従って、例えば、果実の収量、又はクルクリン A の含有量などの変動を受けやすく、しかも、クルクリゴ・ラチフォリアの果実の処理が煩雑であるので、クルクリンの大量生産は困難であった。近年、遺伝子工学的技術を用いた微生物への有用遺伝子の導入の試みが数多く進められ、これまで大量生産が困難であった有用タンパク質の大量生産が可能となった。例えば、特開平 6 - 1 8 9 7 7 1 号公報では、クルクリン B の cDNA をコードする全塩基配列を解明し、クルクリン B をコードする cDNA をクローン化したプラスミドで形質転換した微生物により、組換えクルクリン B を生産させている。しかし、この組換えクルクリン B は、宿主として大腸菌を用いて生産されており、大腸菌由来であるため、食品としては一部の消費者に避けられる傾向があり、微生物由来ではないクルクリンの生産方法の開発が待たれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者は、食品用と

して更に好適で、大量生産が可能な、クルクリンの製造方法を鋭意探索したところ、植物由来の形質転換細胞又はそれを含む形質転換植物を用いることによって、これらの課題を解決することができることを見出した。また、本発明者は、その製造方法により製造されたクルクリンBが、意外にも、酸味を抑制して酸味を軽減ないし無味化する活性を有することを見出した。この酸味抑制活性は、従来公知のクルクリン活性（すなわち、それ自体が甘味を有するか、あるいは酸味を甘味に感じさせる活性）とはまったく異なる活性である。本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は（２）前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、酸味抑制剤に関する。

【0006】また、本発明は、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA、又は（２）前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドをコードするDNAを、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列と、植物で機能することのできるターミネーターを含む配列との間を含むことを特徴とする、プラスミドに関する。また、本発明は、前記プラスミドで、植物（但し、クルクリゴ・ラチフォリアを除く）由来の細胞を形質転換して得られることを特徴とする、形質転換細胞に関する。また、本発明は、前記形質転換細胞を含む、形質転換植物に関する。更に、本発明は、前記形質転換細胞又は前記形質転換植物から、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は（２）前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを抽出することを特徴とする、前記ポリペプチドの製造方法に関する。

【0007】本明細書において、「植物」とは、生物全体を、微生物、動物、及び植物に分類した場合の植物であって、光合成が可能な多細胞の分化有機体、又はその一部分を意味する。前記「植物」には、コケ、シダ、裸子植物、及び被子植物などが含まれる。また、前記の光合成が可能な有機体における一部分も、それ自体が光合成を行わない部分（例えば、果実又は根など）であっても、本発明の植物に含まれる。また、「植物細胞」とは、植物に由来する任意の細胞を意味し、例えば、プロトプラスト、未分化組織（例えば、カルス）、種子、胎芽、花粉、植物胚、不定胚、又は人工種子などを含む。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の酸味抑制剤は、有効成分として、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は（２）配列表の配列番号1で表わされる前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを含有する。配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含む前記ポリペプチドとしては、例えば、配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるクルクリンBを挙げることができる。配列表の配列番号1で表わされる前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有する前記ポリペプチドを、以下、クルクリンB類似体と称する。

【0009】本明細書において、「クルクリンB類似体」とは、クルクリンBのアミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、しかも酸味抑制作用を有するポリペプチドを意味する。付加、欠失、又は置換することのできるアミノ酸の数及び種類は特に限定されるものではなく、その酸味抑制作用に基づいて、当業者が適宜、類似体を作成することができる。

【0010】本明細書において「酸味抑制活性」とは、酸味を示す飲食物の酸味を抑える活性、すなわち、酸味を軽減ないし無味化する活性を意味する。或る化合物が前記酸味抑制活性を有するか否かは、例えば、以下に示す官能試験によって決定することができる。すなわち、はじめに、酸味レベル基準物質水溶液（例えば、約0.1Mクエン酸水溶液）を口中にふくみ、酸味の基準レベルを記憶する。次に、酸味を全く感じなくなるまで、口中を水で十分に（例えば、数回）すすぐ。所定濃度の供試化合物水溶液（例えば、クルクリンB類似体水溶液）所定量（例えば、約2～5ml）を口中に所定時間（例えば、約2～5分間）ふくみ、その後、それを吐き出す。必要により、口中を水で軽くすすぐ。続いて、前記の酸味レベル基準物質水溶液を、前記と同じ方法で口中にふくみ、そのときに感じる酸味レベルと、前記の酸味基準レベルとの差異を判定する。前記の酸味基準レベルよりも酸味レベルが有意に抑制されるか否かによって、酸味抑制活性を有するか否かを決定することができる。

【0011】本発明のプラスミドは、少なくとも、

（１）植物で機能することのできるプロモーターを含む配列、（２）クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA、及び（３）植物で機能することのできるターミネーターを含む配列を、そのプラスミド上に含む。前記プロモーターを含む配列は、クルクリンB又はその類似体をコードするDNAの5'上流側に位置し、

そして、前記ターミネーターを含む配列は、クルクリン又はその類似体をコードするDNAの3'下流側に位置する。

【0012】クルクリンBは、配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなる。クルクリンBは、N末端にシグナルペプチド（配列表の配列番号2で表わされるアミノ酸配列における第22番目のアミノ酸～第1番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなるペプチド）を含み、更に、C末端に延長ペプチド（配列表の配列番号2で表わされるアミノ酸配列における第115番目のアミノ酸～第136番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなるペプチド）を含む、配列表の配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体（すなわち、未成熟体）の形で植物細胞内で産生され、プロセッシングによりこのシグナルペプチド及び延長ペプチドが脱離して、配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなる成熟体になるものと推定されている。

【0013】本発明のプラスミドにおいては、クルクリンBをコードするDNAに代えて、クルクリンBをコードする塩基配列を含むDNAを用いることができ、このようなDNAとして、例えば、「成熟体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第77番目の塩基～第418番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNA、シグナルペプチド及び延長ペプチドの両方を含む「前駆体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第11番目の塩基～第484番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNA、シグナルペプチドを含むが延長ペプチドが欠失している「延長ペプチド欠失-前駆体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第11番目の塩基～第418番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNA、又は延長ペプチドを含むがシグナルペプチドが欠失している「シグナルペプチド欠失-前駆体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第77番目の塩基～第484番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNAなどを用いることができる。

【0014】本発明のプラスミドにおいては、クルクリンBをコードするDNAに代えて、クルクリンB類似体をコードするDNA、又はクルクリンB類似体をコードする塩基配列を含むDNAを用いることができる。クルクリンB類似体をコードする塩基配列を含むDNAとして、クルクリンBをコードする塩基配列を含むDNAの場合と同様に、例えば、成熟体、前駆体、延長ペプチド欠失-前駆体型、又はシグナルペプチド欠失-前駆体などの種々のクルクリンB類似体をコードする塩基配列からなるDNAを用いることができる。

【0015】クルクリンB又はクルクリンB類似体をコ

ードするDNAは、例えば、公知の遺伝子工学的手法若しくは化学合成法、又はそれらの組合せによって調製することができる。クルクリンB cDNA又はクルクリンB類似体cDNAを含むプラスミドが得られている場合には、ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCR法と称する）により所望のDNAを容易に調製することができる。例えば、前駆体型クルクリンBをコードする塩基配列を含むcDNA（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列）を保持するプラスミドpQ9（プラスミドpQ9の構造及び調製方法については、特開平6-189771号公報に開示されており、その調製方法の概要については、後述する実施例1に示す）は、シグナルペプチドをコードする塩基配列（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第11番目の塩基～第76番目の塩基からなる塩基配列）、成熟型クルクリンBをコードする塩基配列（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第77番目の塩基～第418番目の塩基からなる塩基配列）、及び延長ペプチドをコードする塩基配列（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第419番目の塩基～第484番目の塩基からなる塩基配列）を含むので、適当なプライマーを選択し、前記プラスミドpQ9を鋳型として用いるPCR法を実施することによって、成熟体、前駆体、延長ペプチド欠失-前駆体型、又はシグナルペプチド欠失-前駆体などの種々のクルクリンBをコードする塩基配列を調製することができる。

【0016】PCR法に用いるプライマーとしては、例えば、オリゴデオキシリボヌクレオチド、又はオリゴリボヌクレオチドを使用することができる。センスプライマーとしては、例えば、目的タンパク質のアミノ末端部（アミノ末端のアミノ酸を含む）の任意の長さ（通常、6～10個）のアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'側末端に、タンパク質翻訳の開始コドン（ATG）配列を連結した合成ヌクレオチドを設計することができる。なお、目的タンパク質のアミノ末端がATGである場合には、ATG配列を連結するとATG配列が重複するので、目的タンパク質のアミノ末端部の任意の長さのアミノ酸配列をコードする塩基配列を、そのままセンスプライマーとして用いることができる。また、センスプライマーに、翻訳開始周辺の塩基配列に関して翻訳効率に関与すると言われる、いわゆるコザックの法則〔Kozak等, Microbiol. Reviews, 47巻, 第1頁～第45頁（1983年）〕に従う塩基配列ACCATGGを付加することも、タンパク質の生産量を高める上で好ましい。

【0017】アンチセンスプライマーとしては、例えば、目的タンパク質のカルボキシ末端部（カルボキシ末端のアミノ酸を含む）の任意の長さ（通常、6～10個）のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'側末端に、タンパク質翻訳の停止コドン（TAA、TAG、又

10

20

30

40

50

はTGA)配列を1個又は複数個(好ましくは1又は2個、より好ましくは2個)を連結した合成ヌクレオチドを設計することができる。

【0018】また、PCR法を行なうことにより増幅した断片のセンスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーの5'末端に、前記断片を挿入したい部位を切断することのできる制限酵素に対応した制限酵素切断部位を設けると、プロモーター配列又はターミネーター配列、所望によりイントロン配列を含んでなる配列の前記制限酵素切断部位に前記断片を挿入することができるので、好ましい。

【0019】本発明のプラスミドにおいて用いることのできるプロモーターは、植物で機能することのできるプロモーターであれば特に限定されるものではなく、クルクリゴ・ラチフォリアのクルクリンプロモーター以外のプロモーターであることが好ましい。ここで「植物で機能することのできるプロモーター」とは、そのプロモーターを植物内に導入した場合に、RNAポリメラーゼが特異的に結合してその下流方向に転写をはじめることができるプロモーターを意味する。前記プロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター[ザ・エンボジャーナル、第6巻、第3901頁～第3907頁(1987年)]、アクチンプロモーター(特にはイネアクチンプロモーター)[R. Wu等、ザ・プラントセル、第2巻、第163頁～第171頁(1990年)]、ユビキチンプロモーター(特にはトウモロコシユビキチンプロモーター)[Christensen, プラント・モレキュラー・バイオロジー、第18巻、第675頁～第689頁(1992年)]、又はTR1'プロモーター若しくはTR2'プロモーター等を挙げることができる。宿主としてイネを用いる場合には、ユビキチンプロモーター(特にはトウモロコシユビキチンプロモーター)が特に好ましい。宿主としてミカン科に属する植物(例えば、レモン又はオレンジ等)を用いる場合には、TR1'プロモーター若しくはTR2'プロモーター[A. Vardi等、プラント・サイエンス、第69巻、第199頁～第206頁(1990年)]、又はカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター[T. Hidaka等、Japan. J. Breed., 第40巻、第199頁～第207頁(1990年)]が特に好ましい。

【0020】本発明のプラスミドにおいて用いることのできるターミネーターは、植物で機能することのできるターミネーターであれば特に限定されるものではなく、クルクリゴ・ラチフォリアのクルクリンターミネーター以外のターミネーターであることが好ましい。ここで「植物で機能することのできるターミネーター」とは、そのターミネーターを植物内に導入した場合に、その上流方向からの転写を終結させ、ポリAを付加させることのできるターミネーターを意味する。前記ターミネータ

ーとしては、ノバリンシンターゼターミネーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター、又はオクトピンシンターゼターミネーター等を挙げることができる。宿主としてイネを用いる場合には、ノバリンシンターゼターミネーターが好ましい。宿主としてミカン科に属する植物(例えば、レモン又はオレンジ等)を用いる場合には、オクトピンシンターゼターミネーター[A. Vardi等、プラント・サイエンス、第69巻、第199頁～第206頁(1990年)]、又はノバリンシンターゼターミネーター[T. Hidaka等、Japan. J. Breed., 第40巻、第199頁～第207頁(1990年)]が特に好ましい。植物で機能することのできるプロモーター及び／又はターミネーターを含まないプラスミド(例えば、微生物用のプラスミド)では、植物に導入した際、正常に発現しない。

【0021】本発明のプラスミドにおいて、前記プロモーターを含む配列内の、プロモーターの制御配列を含む配列の3'末端と、前記ターミネーターを含む配列内の、ターミネーターの制御配列を含む配列の5'末端との間に、植物で機能することのできるイントロンを更に設けると、遺伝子の発現効率を上げることができたり、あるいは、mRNAの安定性を上げることができるので好ましい。ここで「植物で機能することのできるイントロン」とは、そのイントロンを植物に導入した場合に、mRNAの核外への移行又はスプライシングに際し、取り除くことのできるイントロンを意味する。前記イントロンとしては、例えば、ヒマ・カタラーゼイントロン[田中等、ヌクレイック・アシッド・リサーチ、第18巻、第6767頁～第6770頁(1990年)]、又はトウモロコシユビキチンイントロン[Christensen, プラント・モレキュラー・バイオロジー、第18巻、第675頁～第689頁(1992年)]が使用できる。宿主としてイネを用いる場合は、トウモロコシユビキチンイントロンが特に好ましい。

【0022】本発明のプラスミドでは、イントロンを設ける場合に、イントロンを挿入する場所は、前記範囲内であれば特に限定されるものではないが、プロモーターを含む配列と、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNAとの間に挿入することが好ましい。なお、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA中へ前記イントロンを挿入する場合にも、その箇所は特に限定されるものではない。

【0023】本発明のプラスミドの構築手順は特に限定されるものではなく、例えば、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA、及び植物で機能することのできるターミネーターを含む配列をすべて連結した後に適当なプラスミドに一度に挿入することもできるし、それぞれ別々に適当なプラスミドに順次挿入するこ

ともできる。一般には、植物で機能することのできるプロモーター及びターミネーター、場合により更にイントロンを含むプラスミドを予め調製し、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNAを前記プラスミドに挿入することが好ましい。

【0024】植物で機能することのできるプロモーター及びターミネーター、場合により更にイントロンを含むプラスミドであって、プロモーターとターミネーターとの間に所望のDNAを挿入することのできる前記プラスミドとしては、例えば、pUBA [土岐等, プラント・フィジオロジー, 第100巻, 第1503頁~第1507頁(1992年)], 又はpBI121 (クローンテック社)などを挙げる事ができる。プラスミドpUBAは、パーティクルガン法等の直接導入法に用いることができ、プロモーターに続くイントロンと、ターミネーターとの間に所望のDNAを挿入することができる。また、プラスミドpBI121は、アグロバクテリウムを介した導入法に用いることができ、プロモーターとターミネーターとの間に所望のDNAを挿入することができる。

【0025】本発明による形質転換細胞の宿主として用いることのできる植物由来の細胞における前記植物としては、クルクリンB・ラチフォルアを除く任意の植物を用いることができ、高等植物を用いることが好ましく、食用植物を用いることがより好ましい。本明細書において、「食用植物」とは、それ自体の一部若しくは全部を直接食用とすることのできる植物、又はそれ自体の一部若しくは全部を食品の原料とすることのできる植物を意味する。前記食用植物としては、例えば、ナス科(トマト、若しくはジャガイモ等)、アブラナ科(アブラナ、ダイコン、キャベツ、ブロッコリー、若しくはカリフラワー等)、セリ科(ニンジン等)、ウリ科(メロン、若しくはキュウリ等)、イネ科(イネ、若しくはトウモロコシ等)、バラ科(リンゴ、若しくはモモ等)、ミカン科(ミカン、オレンジ、若しくはレモン等)、マメ科(ダイズ等)、キク科(レタス、ヒマワリ、若しくはペニバナ等)、又はヒルガオ科(サツマイモ等)などの各植物を挙げることができる。

【0026】構築したプラスミドを植物に導入する方法としては、植物の形質転換法として確立されている任意の方法を利用することができる。このような方法としては、例えば、直接導入法、又はアグロバクテリウムを介した導入方法などを挙げる事ができる。直接導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法又はポリエチレングリコール法を用いて植物プロトプラストへ直接導入することができる。あるいは、マイクロプロジェクトイルを利用して植物細胞に直接導入するパーティクルガン法などを挙げる事ができる。宿主としてイネを用いる場合は、パーティクルガン法又はアグロバクテリウムを介した導入方法が好ましい。また、形質転換する細胞

としては、使用する導入方法に応じて、その導入方法に適した細胞を用いることができる。宿主としてイネを用いる場合は、適切な細胞として、例えば、未熟種子若しくは完熟種子より摘出した胚、又は誘導したカルスを用いることができる。

【0027】本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、クルクリンB又はクルクリンB類似体を植物内で発現することが可能なカセット(以下、クルクリンBカセットと称することがある)、すなわち、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA、及び植物で機能することのできるターミネーターを含む配列を含むカセットと、植物内で選抜マーカー遺伝子を発現することが可能なカセット(以下、選抜マーカー遺伝子カセットと称することがある)とを同時に植物細胞に導入することができる。

【0028】選抜マーカー遺伝子としては、例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、又はピアラホス耐性遺伝子などを用いることができる。なお、導入する植物が、単子葉植物であるイネ科植物などの場合は、ピアラホス耐性(bar)遺伝子が大変有効であり[土岐等, プラント・フィジオロジー, 第100巻, 第1503頁~第1507頁(1992年)], 特に好ましい。宿主としてミカン科に属する植物(例えば、レモン又はオレンジ等)を用いる場合には、カナマイシン耐性遺伝子[A. Vardi等, プラント・サイエンス, 第69巻, 第199頁~第206頁(1990年)], 又はカナマイシン耐性遺伝子若しくはハイグロマイシン耐性遺伝子[T. Hidaka等, Japan. J. Breed., 第40巻, 第199頁~第207頁(1990年)]が特に好ましい。

【0029】パーティクルガン法などの直接導入法を用いて本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、例えば、クルクリンBカセットと選抜マーカー遺伝子カセットとを、大腸菌で一般的に用いられる多コピープラスミド(例えば、pUC19)にクローン化し、植物細胞に導入することができる。その場合、クルクリンBカセットと選抜マーカー遺伝子カセットとを、

(1) 同一プラスミド上に保持させて導入することもできるし、あるいは(2) 別々のプラスミド上に保持させ、それらのプラスミドを混合して導入する(いわゆる、コトランスフォーメーション)こともできる。コトランスフォーメーションにより本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、例えば、クルクリンBカセット及び選抜マーカー遺伝子カセットの内、選抜マーカー遺伝子カセットのみを保持するプラスミドとして、bar遺伝子がイネアクチンプロモーターとノバリンシンターゼターミネーターとの間に含まれているプラスミドpDM302 [R. Wu等, プラントセルレポート, 第11巻, 第586頁~第591頁(1992

年)] を使用し、別に調製したクルクリン B カセットを有するプラスミド、及び前記プラスミド p D M 3 0 2 の 2 種類のプラスミド DNA を混合してコトランスフォームさせることができる。

【 0 0 3 0 】 また本発明で、アグロバクテリウムを介した導入法を用いて本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、例えば、クルクリン B カセットと選抜マーカ遺伝子カセットとを同一プラスミド上に保持するアグロバクテリウム用のバイナリープラスミドを作成し、植物細胞に導入することができる。例えば、クル

クリン B 又はクルクリン B 類似体をコードする DNA (例えば、クルクリン B c DNA) を、カナマイシン耐性遺伝子を有するバイナリーベクター p B I 1 2 1 のカリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターとノバリンシンターゼターミネーターとの間にクローン化し、このバイナリープラスミドを有するアグロバクテリウムを植物細胞に感染させ、カナマイシン耐性能により選抜することによって、形質転換細胞を得ることができる。

【 0 0 3 1 】 このようにして得られた遺伝子を導入した細胞から、スクリーニングの上、任意の方法で植物体を再生させることができる。イネの場合は、例えば、遺伝子を導入した細胞を、選択マーカに対応した選択薬剤 (例えば、選択マーカがピアラホス耐性遺伝子の場合には、ピアラホス 1 0 p p m) 及び植物ホルモンを含む N 6 培地に置き換え、適切に培養すると、4 ~ 8 週間遺伝子導入により形質転換した細胞 (カルス) を得ることができる。得られたカルスを、適切な増殖培地 (例えば、ピアラホス 1 0 p p m 及び植物ホルモンを含む N 6 培地) に移し、更に、適切な再分化培地 (例えば、ピアラホス 1 0 p p m 及び植物ホルモンを含む M S 培地) で培養すれば、形質転換したイネ植物を得ることができる。なお、細胞中のクルクリン B 又はクルクリン B 類似体の発現は、免疫学的に解析 (例えば、ウエスタン解析) することで確認することができる。

【 0 0 3 2 】 このようにして得られた形質転換細胞又は形質転換植物から公知の方法により、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を抽出することができる。例えば、形質転換細胞、又は形質転換植物 (全体又はその一部分) を破碎し、適切な洗浄液 [例えば、5 0 m M - T r i s バッファー (p H 7 . 0) 、又は 0 . 0 1 5 N 硫酸等] で洗浄し、水溶性タンパク質を除去する。沈殿物に適切な抽出液 [例えば、0 . 5 M - N a C l を含む 5 . 0 m M - T r i s バッファー (p H 7 . 0) 、又は 0 . 0 5 N 硫酸等] を入れ、一晚振とう抽出し、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体抽出液を得ることができる。この抽出液に 7 . 0 % 飽和硫酸アンモニウムを添加し、遠心により沈殿を回収する。この沈殿を 0 . 2 M 酢酸 2 . 5 m l に溶解し、脱塩用カラム P D 1 0 (ファルマシア社製) を用いて脱塩する。こうして得られたクルクリン B 又はクルクリン B 類似体タンパク質溶液を凍結乾燥する

ことにより、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を得ることができる。クルクリン B 又はクルクリン B 類似体抽出に使用することのできる前記形質転換植物は、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を含んでいれば特に限定されず、植物全体、又はその一部、例えば、葉、茎、地下茎、根、塊根、果肉、又は種子などを使用することができる。また、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体の抽出のみが達成できれば十分である場合には、植物を再生させる必要はなく、プロトプラスト、又はカルス等の形質転換細胞をそのまま破碎等して、抽出することができる。

【 0 0 3 3 】 本発明による酸味抑制剤は、これに限定されるものではないが、例えば、酸味を示す化合物 (例えば、アスコルビン酸又は酢酸など) を添加した飲食物、又はそれ自体酸味を示す飲食物に対して、酸味のみを低減又は無味化するのに有用である。例えば、酸化剤及び / 又はビタミン C 補強剤としてアスコルビン酸が添加されている飲食物 (例えば、茶などの缶又は瓶入り飲料) に、本発明による酸味抑制剤を添加することにより、アスコルビン酸の酸味のみを低減することができる。また、防菌剤又は静菌剤として酢酸が添加されている飲食物 (例えば、弁当、漬物、サラダ、又はパック米など) に、本発明による酸味抑制剤を添加することにより、アスコルビン酸の酸味のみを低減することができる。また、それ自体酸味を示す飲食物としては、例えば、果汁飲料を挙げることができ、それ自体酸味を示す飲食物に本発明の酸味抑制剤を添加することにより、酸味を調節することができる。

【 0 0 3 4 】 本発明の形質転換植物は、それ自体をそのまま食用とすることもできる。例えば、酸味のみが抑制されると付加価値が向上する作物 [例えば、柑橘類 (例えば、温州ミカン、ユズ、キンカン、グレープフルーツ、バレンシア、ザボン、ハッサク、レモン、イヨカン、バンベイユ、サンボウカン、ライム、又は夏ミカンなど) 、キウイフルーツ、パイナップル、アセロラ、又はトマトなど] 中で、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を発現させると、その植物が本来有する酸味のみを抑制した形質転換植物を得ることができる。また、作物それ自身は酸味を有していないが前述したようにアスコルビン酸又は酢酸などを添加した飲食物と同時に食する可能性のあるような作物中で、クルクリン B 又はクルクリン B 類似体を発現させることにより前述の酸味抑制剤と同様の効果を得ることができる。前記の各種の形質転換植物は、前記の公知方法を用いて作出することができる。

【 0 0 3 5 】

【実施例】 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例 1】 クルクリン B 又はクルクリン B 類似体遺

伝子発現用プラスミドの構築

まず、以下の手順で、シグナル配列及び延長配列を含む前駆体型クルクリンBをコードするcDNA、及びシグナル配列は含むが延長配列を欠失させた延長ペプチド欠失-前駆体型クルクリンBをコードするcDNAをPCR法により作成した。配列番号4で表わされる塩基配列からなるプライマーCURN1及び配列番号5で表わされる塩基配列からなるプライマーCURC4の2種類をプライマーとし、特開平6-189771号公報に記載のプラスミドpQ9を鋳型とし、増幅用酵素としてPfu-DNAポリメラーゼ（宝酒造）を用いてPCRを行った。なお、プラスミドpQ9は、特開平6-189771号公報の実施例1～10に記載の方法により調製した。すなわち、クルクリゴ・ラチフォリアの果実から抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成し、クルクリンAのアミノ酸配列（特開平3-190899号公報に記載）から設計したプローブで選抜することによりプラスミドpQ9を得た。

【0036】増幅されたDNA断片を大腸菌ベクターpUC19（東洋紡製）のSmaI部位にクローン化した後、BamHI（東洋紡製）及びSacI（東洋紡製）の2重切断をし、クルクリンB cDNAを含むDNA断片を精製した。この断片をトウモロコシユビキチンプロモーター、トウモロコシユビキチンイントロン、及びノバリンシンターゼターミネーターを有するプラスミドpUBA【土岐等、プラント・フィジオロジー、第100巻、第1503頁～第1507頁（1992年）】のBamHI部位とSacI部位との間に存在するピアラホス耐性（bar）遺伝子と置換する形でサブクローニングし、プラスミドpMCU42を得た。pMCU42は、シグナル配列及び延長配列を含む前駆体型クルクリ

ンB遺伝子を有していた。図1に、プラスミドpMCU42の構造を模式的に示す。図1において、「nos」はノバリンシンターゼを意味する。

【0037】同様に、前記プライマーCURN1及び配列番号6で表わされる塩基配列からなるプライマーCURC5の2種類のプライマーを用いて、前記のように、DNA断片を増幅し、pUC19のSmaI部位にクローン化した後、BamHI及びSacIで二重切断し、pUBAのBamHI部位とSacI部位との間に存在するピアラホス耐性（bar）遺伝子と置換する形でサブクローニングし、プラスミドpMCU43を得た。pMCU43は、シグナル配列は含むが延長配列を欠失させた延長ペプチド欠失-前駆体型クルクリンB遺伝子を有していた。図2に、プラスミドpMCU43の構造を模式的に示す。図2において、「nos」はノバリンシンターゼを意味する。

【0038】

【実施例2】 イネの形質転換

2-1. 完熟種子からの胚組織摘出

イネ品種日本晴の完熟種子を脱粒後、3.5%次亜塩素酸カルシュウム溶液中で、脱気攪拌しながら殺菌を30分間行った。その後、滅菌水で充分洗浄してから、滅菌濾紙上で水分を除き、表1に示すカルス誘導培地Aに置床し、25℃暗所で培養した。培養6日後、肥大してきた胚組織のみを摘出した。摘出した組織は胚盤側を上にしてカルス誘導培地Aの入った6cmシャーレに並べた。並べ方は半径1cmの円周上に沿って10～20個並べてショット用シャーレとした。

【0039】

【表1】

	カルス誘導培地A	カルス誘導培地B	再分化培地
基本塩類組成	N6	N6	MS
ビタミン	添加	添加	添加せず
シュクロース(g/l)	20	20	10
ソルビトール(g/l)	0	0	50
2, 4-D(ppm)	3	3	0
NAA(ppm)	0	0	0.5
カイネチン(ppm)	0	0	0.5
ジュランガム(g/l)	4	4	4
ピアラホス(ppm)	0	10	10
pH	5.8	5.8	5.8

（表中、基本塩類組成の欄に示す「N6」は、463mg/l-(NH₄)₂SO₄、2830mg/l-KNO₃、400mg/l-KH₂PO₄、1.6mg/l-H₃BO₃、4.4mg/l-MnSO₄・4H₂O、

1.5mg/l-ZnSO₄・7H₂O、0.8mg/l-KI、166mg/l-CaCl₂・2H₂O、185mg/l-MgSO₄・7H₂O、37.3mg/l-Na₂-EDTA、及び27.8mg/l-

FeSO₄ · 7H₂Oを意味し、基本塩類組成の欄に示す「MS」は、1650mg/l-NH₄NO₃、1900mg/l-KNO₃、170mg/l-KH₂PO₄、6.2mg/l-H₃BO₃、22.3mg/l-MnSO₄ · 4H₂O、8.6mg/l-ZnSO₄ · 7H₂O、0.83mg/l-KI、0.25mg/l-Na₂MoO₄ · 2H₂O、0.025mg/l-CuSO₄ · 5H₂O、0.025mg/l-CoCl₂ · 6H₂O、440mg/l-CaCl₂ · 2H₂O、370mg/l-MgSO₄ · 7H₂O、37.3mg/l-Na₂-EDTA、及び27.8mg/l-FeSO₄ · 7H₂Oを意味し、「ビタミン」は、0.5mg/lニコチン酸、0.5mg/lピリドキシン塩酸、1mg/lチアミン塩酸、及び2mg/lグリシンを意味し、「2,4-D」は2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を意味し、「NAA」はナフタレン酢酸を意味する)

【0040】2-2. パーティクルガンによる遺伝子導入

パーティクルガン装置は、空気圧式のレーボック商工モデル260を用いた。実施例1で構築したプラスミドpMCU42又はpMCU43と、ピアラホス耐性遺伝子を有するpDM302 [R. Wu等; プラントセルレポート, 第11巻, 第586頁~第591頁(1992年)]とを1:1に混合したDNA液16μlを、森川らの方法[植物細胞工学, 第4巻, 第43頁~第48頁(1992年)]に準じて、1ミクロン金粒子にコーティングし、専用プロジェクタイト(弾)に乗せ、自然乾燥した。1弾当たり0.1mg金粒子及び0.4μgDNAを含む弾を、ショット用シャーレに2弾ショットして(発射圧力=ポンピング8回、試料間距離=6cm)、2種類の遺伝子を導入した。

【0041】2-3. 形質転換カルスの選択培養及び植物体への再分化

前記実施例2-2でショットしたシャーレより胚組織を、選択薬剤ピアラホス10ppmを更に含む、表1に示すカルス誘導培地Bに置き換え、25℃暗所で7日間培養した後、明所(3000lux)で培養を継続した。培養4~8週間で遺伝子導入によるピアラホス耐性カルスを胚盤上に確認して、カルス部分を切り出し、カルス誘導培地Bで増殖培養し、pMCU42で形質転換されたイネ由来のカルスMCU42-15と、pMCU43で形質転換されたイネ由来のカルスMCU43-46とを得た。このカルスを表1に示す再分化培地に移植し、25℃、明所(3000lux)で4~8週間培養し、再分化個体を得た。

【0042】

【実施例3】 ウェスタン解析によるクルクリンBタンパク質の検出

それぞれの形質転換カルス系統についてウェスタン解析を行い、クルクリンB発現を調べた。カルスからのタン

パク質試料の抽出は、カルス0.1gに50mMトリス-塩酸(pH7.0)200μlと海砂とを加え、ハンドホモゲナイザーで抽出した。得られた抽出液を12,000rpmで10分間遠心し、その上澄液をタンパク質濃度測定して試料とした。1ウェルあたりタンパク質50μgの量の試料を15-25%グラジエントSDSポリアクリルアミドゲル(第一化学, マルチゲル)電気泳動で展開し、PVDf膜に転写した後、ウサギ抗クルクリンB血清を一次抗体に、HRP標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体にして、反応するバンドをコニカ発色キット(コニカ社)で、免疫化学的に検出した。

【0043】その結果を図3に示す。レーン1は、プラスミドpMCU42による形質転換カルスMCU42-15の結果を、レーン2は、プラスミドpMCU43による形質転換カルスのMCU43-46の結果を、レーン3は、コントロールとしての非形質転換カルス(イネ品種=日本晴)の結果を、レーン4は天然クルクリンの結果をそれぞれ示す。形質転換カルス試料では天然クルクリンとほぼ同じ位置にバンドが検出され、イネカルスでのクルクリンBタンパク質の発現を確認した。非形質転換カルスには、反応するバンドは認められなかった。

【0044】

【実施例4】 組換えクルクリンBの精製とN末端アミノ酸配列の決定

実施例2で得られたイネカルスMCU43-46の40gを乳鉢と乳棒を用いて破碎し、50mM-Tris-塩酸バッファー(pH7.0)80mlで抽出し、遠心後の上清を捨て、水溶性タンパク質を除去した。カルス沈殿物に0.5M-NaClを含む50mM-Tris-塩酸バッファー(pH7.0)80mlを入れ、一晩振とう抽出し、遠心によりクルクリン抽出液を得た。この抽出液に70%飽和硫酸アンモニウムを添加し、遠心により沈殿を回収した。この沈殿を0.2M酢酸2.5mlに溶解し、脱塩用カラムPD10(ファルマシア社製)を用いて脱塩した。こうして得られたクルクリンBタンパク質を含む粗精製画分を凍結乾燥し、0.5M-NaClを含む50mM-Tris-塩酸バッファー(pH7.0)3mlに溶解した。この溶液の一部を15%ゲル(第一化学社製, マルチゲル)のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離後、PVDf膜に電氣的にプロットした。この膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、その後、5.0%メタノールで脱染した。目的とするタンパク質バンドの部分を切り出し、プロテインシークエンサー(島津PPSQ10)によりN末端アミノ酸配列を決定したところ、N末端から第10番目までのアミノ酸配列が、配列表の配列番号7で表わされるアミノ酸配列であることが判明した。このアミノ酸配列は、導入したcDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列と完全に一致した。

【0045】

【実施例 5】 粗精製組換えクルクリン B の官能試験
前記実施例 2 で得られたイネカルス MCU 43-46 又はイネカルス MCU 42-15 各 40 g から、前記実施例 4 に記載の方法に従って、クルクリン B タンパク質を含む粗精製画分を得た。また、コントロールとして、非形質転換カルス（イネ品種＝日本晴）40 g から、同様にして粗精製画分を得た。これらの粗精製画分を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物各 25 mg を水 12 ml に溶解し、クルクリン B タンパク質含有サンプル 2 種類と、コントロールサンプル 1 種類を得た。得られたサンプル 10 を以下の官能試験に使用した。

【0046】官能試験は以下に示す手順で実施した。すなわち、はじめに、0.1 M クエン酸水溶液 3 ml を口中に含み、酸味の基準レベルを記憶した。次に、口中を水で強く 3 回すすぎ、酸味が全く感じられない状態にした。続いて、前記のクルクリン B タンパク質含有サンプル又はコントロールサンプル 3 ml を口中に 3 分間含み、その後、それを吐き出した。口中を水で軽く 1 回すすいだ後に、再度、0.1 M クエン酸水溶液 3 ml を口中に含み、その際に感じる酸味と、前記の基準レベルの 20

配列

Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Ala	Asp	His	Ser	Leu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gly	Ala	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Cys	Asn	Leu	Val
				20				25						30	
Lys	Tyr	Gln	Asn	Gly	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala	Ser	Asn	Thr	Asp	Arg	Arg
			35				40						45		
Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	Gly	Asn	Leu	Val	Ile
			50				55						60		
Tyr	Asp	His	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Trp	Gly	Ser	Ala	Cys	Trp	Gly	Asp
			65				70						75		80
Asn	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Lys	Asp	Gly	Arg	Phe	Val	Ile

酸味との差異を比較した。その結果、コントロールサンプルの場合には、酸味のレベルに差異が認められなかったのに対して、クルクリン B タンパク質含有サンプルの場合には、クエン酸の酸味が感じられなかった。

【0047】

【発明の効果】本発明によれば、食品用として好適なクルクリン B 又はクルクリン B 類似体を大量に生産することが可能である。また、本発明の酸味抑制剤によれば、酸味を示す化合物（例えば、アスコルビン酸又は酢酸など）を添加した飲食物、又はそれ自体酸味を示す飲食物に対して、酸味のみを低減するのに有用である。

【0048】

【配列表】

【0049】配列番号：1

配列の長さ：114

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

起源：生物名：クルクリゴ・ラチフォリア (Curculigo latifolia)

19 20
 Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp Val Trp Gly
 60 65 70
 Ser Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys
 75 80 85 90
 Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly Pro
 95 100 105
 Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly Gly Ile Thr Val Ala Lys Asp Ser
 110 115 120
 Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn Asn
 125 130 135

【 0 0 5 1 】 配列番号 : 3

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 1 1 6 6

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

CGCAAAGACA ATG GCG GCC AAG TTT CTT CTC ACC ATT CTT GTC ACC TTT 49
 Met Ala Ala Lys Phe Leu Leu Thr Ile Leu Val Thr Phe
 -20 -15 -10
 GCG GCC GTC GCT AGC CTT GGC ATG GCC GAC AAT GTC CTG CTC TCC GGG 97
 Ala Ala Val Ala Ser Leu Gly Met Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly
 -5 1 5
 CAA ACT CTG CAT GCC GAC CAC TCT CTC CAG GCG GGC GCC TAT ACC TTA 145
 Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu
 10 15 20
 ACC ATA CAA AAC AAG TGC AAC CTG GTG AAA TAC CAG AAC GGG AGG CAG 193
 Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln
 25 30 35
 ATC TGG GCT AGC AAC ACT GAC AGG CGG GGC TCC GGC TGC CGC CTC ACA 241
 Ile Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr
 40 45 50 55
 TTG CTG AGT GAC GGG AAC CTC GTT ATC TAC GAC CAC AAC AAC AAC GAC 289
 Leu Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp
 60 65 70
 GTG TGG GGG AGC GCC TGC TGG GGG GAC AAC GGC AAG TAT GCT CTT GTT 337
 Val Trp Gly Ser Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val
 75 80 85
 CTT CAG AAG GAT GGC AGA TTT GTC ATC TAT GGC CCG GTT TTG TGG TCC 385
 Leu Gln Lys Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser
 90 95 100
 CTT GGC CCT AAT GGG TGC CGC CGT GTT AAT GGT GGA ATC ACA GTT GCT 433
 Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly Gly Ile Thr Val Ala
 105 110 115
 AAG GAT TCT ACT GAA CCA CAA CAT GAG GAT ATT AAG ATG GTG ATT AAT 481
 Lys Asp Ser Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn
 120 125 130 135
 AAT
 Asn
 136
 TAATCAAGTG AGAGGATTGT TATGAGAATA ATGAGTGGAA TGGAAGACCA ATCTCATGTC 544
 GGTGTGGCCT ATCTCCACCT GTTTGCAGTG CCTTTGTAA AATAACACAT TGGGGAATAA 604
 TAAAGTGAAA CTATATAGAT TGGTTCAGCA AATTTTCTGT TCAGTTTTCC TCTCACATGT 664
 CAATGTCGAT TTTTGGCCGC GGATCATACA TGTGCTTGGT ATTCTAATCG ATAGAATTAT 724

21

GGCTCAAATG GAGGCAGGGA TTATGAGAGT TTATTCGCAT CTCCGGGTCT TCCAACCTTAC 784
 GAATTATAAC AAGATTCAAG GATGCATCTG AGAGCCAACT TAACGTCTTA CATCAAAGGA 844
 GCTAGCCGAA GTTTATTCCC AGAGCTAGAG GAAGTTCGCT GCCATGGTTG ATAGTACAAG 904
 TAGAACGACG CATGTATTGC TTCCAGGAAT CACTTCCAGC TTCTCGACAC CTCCAGTGGC 964
 CTTTTACCA CCGAAAGCAC CACCAATTTC AGCACCATTG GTAGGTATAT TTACATTAAC 1024
 AATACCACAG TCACTGCCAT GGGGTCCAAT CCACTTGAAA ATAACITCAG GTCTACGAGT 1084
 GAAAATAGAA CTGCTTAAAC TTGCGGTACA GAGTTATTTA TTTCAATTGC TTCTTTCAGA 1144
 GTCTGGAATT TCATTACGTA AA 1166

【0052】配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGATCCACCA TGGCGGCCAA GTTTCTTCT

【0053】配列番号：5

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GAGCTCCTAT TAATTATTAA TCACCATCT

【0054】配列番号：6

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GAGCTCCTAT TAACCATTAA CACGGCGGC

【0055】配列番号：7

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu

1

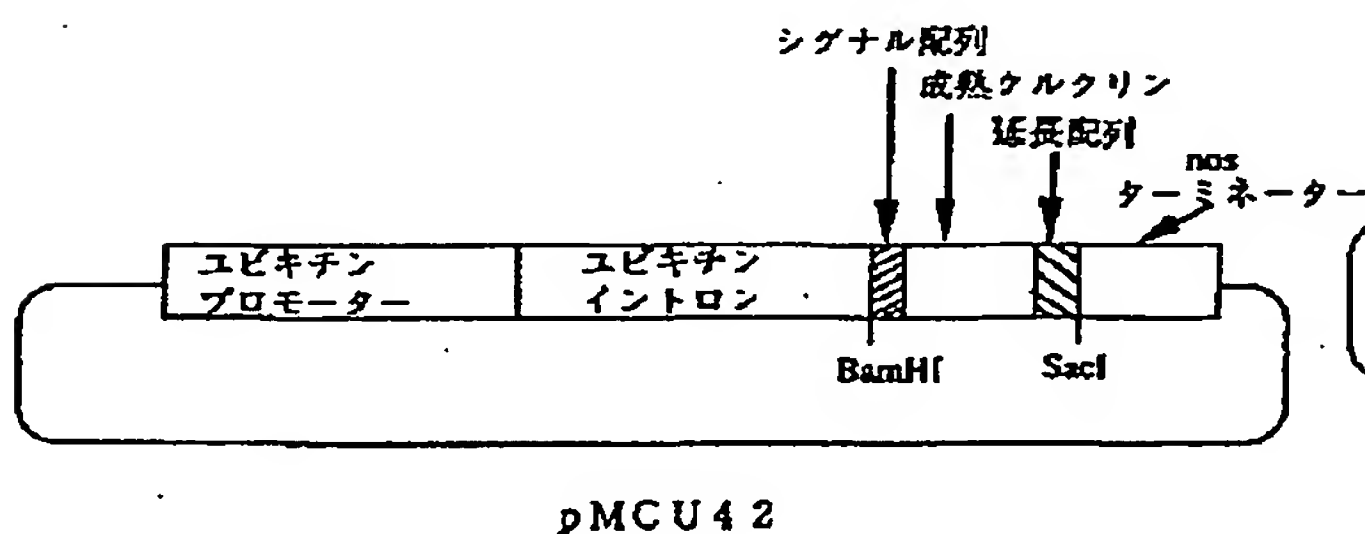
5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 トウモロコシユビキチンプロモーター及びイントロン下流に、シグナル配列、成熟体型クルクリンB、及び延長配列よりなる前駆体型クルクリンB c DNAを連結し、更にその下流にノバリンシンターゼターミネー

【図1】



22

トポロジー：直鎖状

10 アンチセンス：No

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

29

トポロジー：直鎖状

アンチセンス：Yes

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

29

トポロジー：直鎖状

アンチセンス：Yes

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

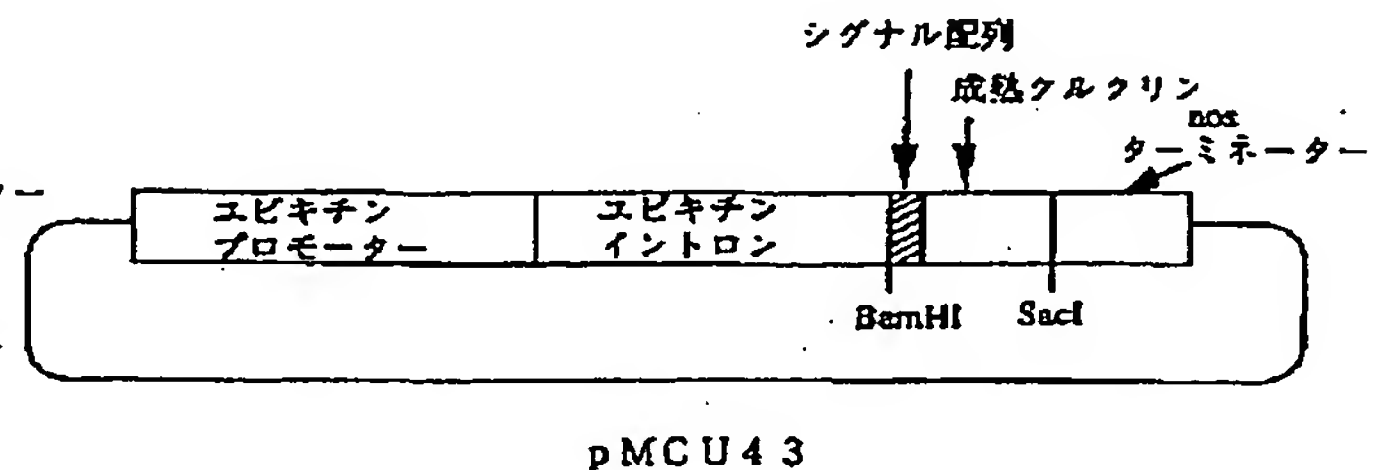
29

ターを連結したプラスミドpMCU42の構造を模式的に示す説明図である。

【図2】 トウモロコシユビキチンプロモーター及びイントロン下流に、シグナル配列及び成熟体型クルクリンBよりなる延長ペプチド欠失-前駆体型クルクリンB c DNAを連結し、更にその下流にノバリンシンターゼターミネーターを連結したプラスミドpMCU43の構造を模式的に示す説明図である。

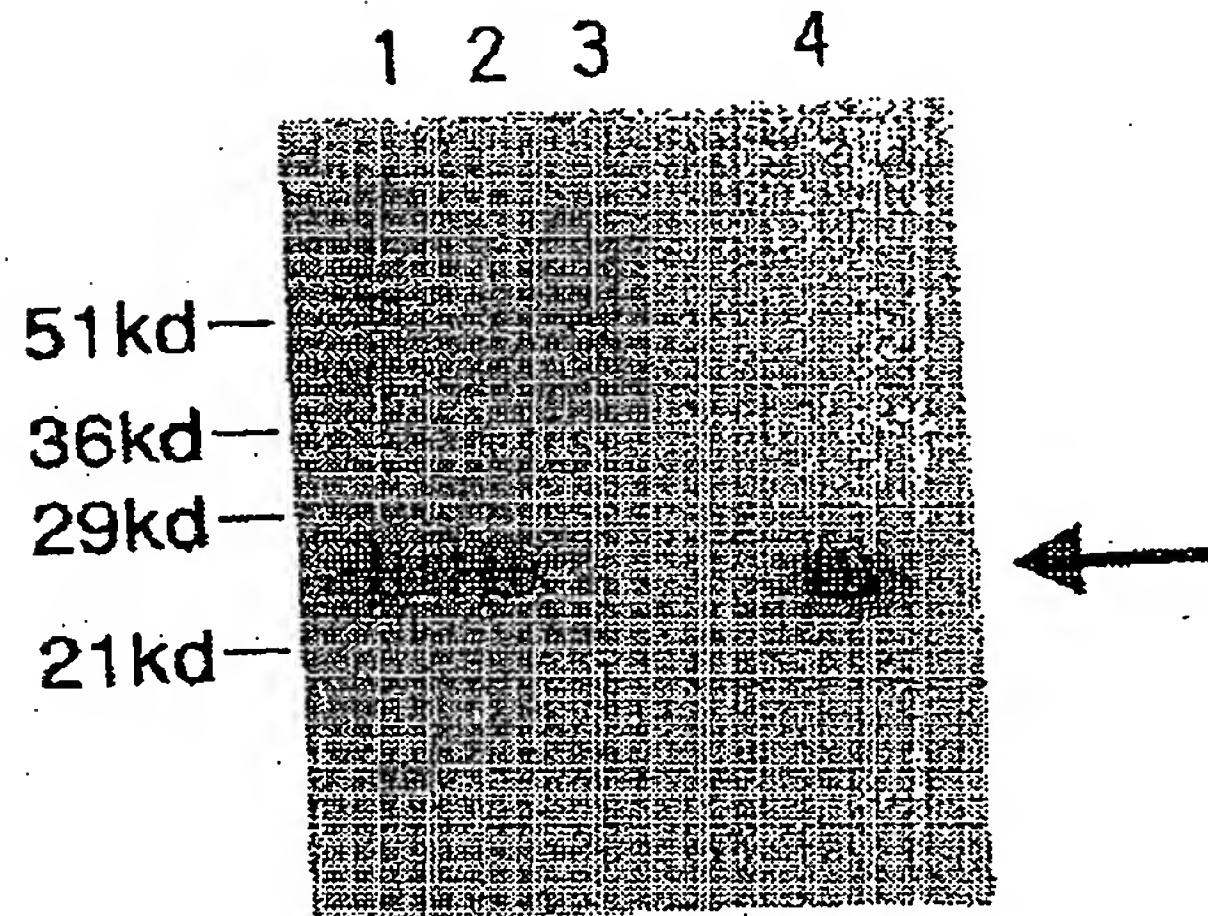
【図3】 ウェスタン解析により検出した、イネカルスにおいて発現した組換えクルクリンBの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図2】



【図 3】

図面代用写真



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F. I	技術表示箇所
C07K 14/415			C07K 14/415	
C12N 5/10			C12P 21/02	C
C12P 21/02			C12N 5/00	C
//(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:91)				
(C12N 5/10				
C12R 1:91)				
(C12P 21/02				
C12R 1:91)				

(72) 発明者 栗原 良枝
東京都世田谷区奥沢 7 - 4 - 7

(72) 発明者 荒井 綜一
神奈川県横浜市神奈川区七島町 3 8

(72) 発明者 安西 弘行
神奈川県横浜市港北区師岡町 7 6 0 番地
明治製菓株式会社薬品総合研究所内

(72) 発明者 勝俣 和子
神奈川県横浜市港北区師岡町 7 6 0 番地
明治製菓株式会社薬品総合研究所内

(72) 発明者 山下 治之
東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番 3 5 号 旭
電化工業株式会社内

(72) 発明者 杉山 宏
東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番 3 5 号 旭
電化工業株式会社内